

乙型脑炎病毒 NS1 蛋白原核表达及其免疫原性分析*

韦艳¹, 王晓芳²

摘要:目的 采用大肠杆菌系统表达乙脑病毒 NS1 蛋白,并对表达产物进行免疫原性分析。方法 将乙脑病毒 NS1 基因克隆入 pET30a 载体中,表达产物经 Ni²⁺亲和层析纯化后行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析;并将纯化产物免疫新西兰大白兔,获得的免疫血清作间接 ELISA 及免疫荧光检测。结果 重组 JEV NS1 蛋白获得表达并纯化成功;Western blot 结果显示纯化蛋白能与 JEV 免疫的鼠多克隆腹水反应;兔免疫血清的间接 ELISA 结果显示血清效价达到 1:51 200 以上;免疫荧光结果显示血清作 1:50、1:100、1:200 稀释时,JEV 感染的 BHK 细胞均显示荧光。结论 重组 NS1 蛋白能在大肠杆菌系统中获得表达;纯化产物具有免疫原性,为进一步研究 NS1 蛋白的生物学特性及乙脑病毒的诊断试剂提供参考依据。

关键词:乙型脑炎病毒;非结构蛋白;原核表达;免疫原性

中图分类号:R 181 文献标志码:A 文章编号:1001-0580(2014)05-0622-03 DOI:10.11847/zgggws2014-30-05-24

Expression of protein NS1 of Japanese encephalitis virus and its immunogenicity

WEI Yan*, WANG Xiao-fang(* Department of Environment Health, School of Public Health, Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou Province 550004, China)

Abstract: Objective To express protein NS1 of Japanese encephalitis virus (JEV) in *Escherichia coli* and to evaluate its immunogenicity. **Methods** JEV NS1 gene was cloned into the pET30a vector. After being purified with Ni-NTA chromatography, the expression products were analyzed with sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot. Rabbits were immunized with the purified protein and their serum was assayed with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescence assay (IFA). **Results** Recombinant NS1 protein was expressed and purified successfully. Western blot results showed that the purified product could react with the ascites of mice immunized with JEV. Indirect ELISA results showed that the serum titer reached above 1:51200. IFA showed that when the serum was diluted to 1:50, 1:100, and 1:200, the fluorescent light could be detected in *Escherichia coli*, and its immunogenicity was verified. The result was observed in baby hamster kidney (BHK) cells infected with JEV. **Conclusion** Recombinant JEV NS1 protein was expressed in *Escherichia coli* and the purified protein was of immunogenicity, which could be used for developing diagnostic reagent of JEV.

Key words: Japanese encephalitis virus; nonstructural protein; prokaryotic expression; immunogenicity

流行性乙型脑炎病毒 (epidemic encephalitis B virus) 又称日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV), 可引起以中枢神经系统损害为主的急性传染病, 在中国多省均有流行报道^[1-2]。JEV 是黄病毒科黄病毒属的成员, 为单股正链 RNA 病毒, 基因组长约 11 kb, 基因结构为含 5' 和 3' 非编码区、3 个结构基因编码 3 种结构蛋白和 7 个非结构基因编码 7 种非结构蛋白, 其排列顺序为 5' NCR-C-PrM/M-E-NS1-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' NCR。其中的 NS1 蛋白是一种非结构分泌型糖蛋白, 在黄病毒蛋白中高度保守, 可诱导机体产生抗体, 在黄病毒的致病机理中也可能发挥作用^[3-4]。本研究采用大肠杆菌系统表达乙脑病毒 NS1 蛋白, 并对表达产物进行免疫原性分析, 在疫苗研制、诊断试剂开发等方面

均具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料 乙型脑炎病毒 SA14-14-2 株由成都生物制品研究所提供, BHK-21 细胞、原核表达载体 pET30a、宿主菌 DH5 α 、BL21 (DE3) 由中国疾病预防控制中心病毒病所出血热室保存, 新西兰大白兔 1 只, 重量 2.1 kg, 购自中国医学科学院实验动物学研究所 (动物合格证号 SCXK (京) 2007-0003)。

1.2 主要仪器与试剂 TRIzol Reagent、SuperScript III 第一链合成试剂盒、Platinum Pfx DNA 聚合酶 (美国 Invitrogen 公司), 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶 (美国 Biolab 公司), DNA 纯化试剂盒 (美国 QIAGEN 公司), 质粒提取试剂盒 (美国 Omega 公

* 基金项目: 国家“十二五”科技重大专项 (2012ZX10004219)

作者单位: 1. 贵阳医学院公共卫生学院环境卫生学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所

作者简介: 韦艳 (1972-), 女, 土家族, 贵州贵阳人, 副教授, 博士, 主要从事病毒性疫苗研究工作。

通讯作者: 王晓芳, E-mail: wangxiaofang90@163.com

数字出版日期: 2014-4-8 11:57

数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20140408.1157.035.html>

司),乙脑病毒免疫的鼠多克隆腹水(中国疾病预防控制中心病毒病所出血热室制备),异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记抗兔 IgG 抗体、辣根过氧化物酶(hydrogen-peroxide oxidoreductase, HRP)酶标抗兔 IgG 抗体(德国 Sigma 公司)。引物合成由上海生工生物工程公司完成。

1.3 方法

1.3.1 细胞及病毒培养 BHK-21 细胞用含 10% 小牛血清的 Eagle's 培养至单层时,接种乙脑病毒 SA14-14-2 株,37 °C、5% CO₂ 条件培养,逐日观察,待 90% 细胞出现病变时,收集培养细胞用于提取病毒 RNA。

1.3.2 病毒 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成 使用 Gibco 公司的 Trizol Reagent 提取。获得的病毒 RNA 用 30 μL 无 RNA 酶的纯水重悬。病毒 cDNA 第一链的合成采用 Invitrogen 公司 SuperScript III 第一链合成试剂盒,操作按说明书进行。

1.3.3 NS1 基因的扩增及重组表达质粒的构建 以 JEV 病毒 cDNA 为模板,采用 Platinum Pfx DNA 聚合酶扩增 JEV NS1 基因。扩增上游引物 P1 为:5'-GGAATTCCATATGGACACTGGAT GTGCCAT-TGAC-3'(下划线为 NdeI 酶切位点,并含 ATG 起始密码子);下游引物为:CCGCTCGAGTTAATGGTGATG-TGTGATGGTGAGCAGCGACTAGCACCACAT-3'(下划线为 Xho I 酶切位点,引入 TAA 终止密码子)。扩增条件为:94 °C 预变性 30 s,94 °C 15 s,52 °C 30 s,68 °C 1.5 min,共 30 个循环,68 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并纯化回收。NS1 基因 PCR 产物与克隆载体 pET30a 用 Nde I 和 Xho I 双酶切,酶切产物纯化回收后采用 T4 DNA 连接酶定向连接,连接产物转化大肠杆菌 H5α。小量制备质粒后并进一步经酶切和测序鉴定(测序工作由北京三博远志生物技术有限责任公司完成)。重组表达质粒命名为 pET30a-JEV NS1。将鉴定正确的质粒转化 BL21 (DE3) 菌株,于 -40 °C 保存菌种。

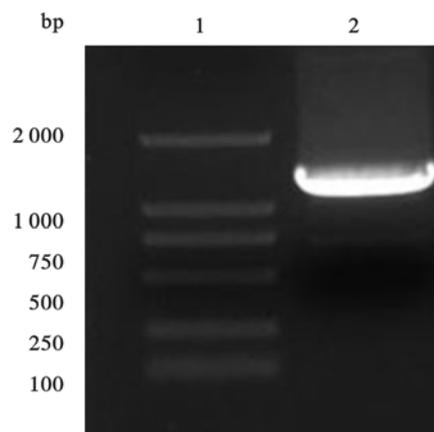
1.3.4 重组蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化 将含 pET30a-JEV NS1 重组质粒的 BL21 (DE3) 菌株接种卡那霉素抗性的培养基 37 °C 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6 时,加入异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(isopropylthio-β-D-galactoside, IPTG) 至终浓度 1 mmol/L,37 °C 继续培养 5 h,收集菌体。超声裂解,离心后用 8 mol/L 尿素溶解沉淀,溶解上清过 HiTrap Chelating HP Ni²⁺ 亲和层析柱,采用不同浓度咪唑洗脱,收集有洗脱峰的洗脱液。洗脱液进一步在含尿素为 7、6、5、4、3、2、1、0 mol/L 的透析缓冲液中透析复性。纯化后蛋白进行十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝

胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)和 Western bolt 分析。

1.3.5 重组蛋白多克隆抗体的制备及检测 取重组 JEV NS1 蛋白免疫新西兰大白兔,免疫方法为皮下及肌肉多点注射,免疫剂量为 200 μg/次,共免疫 4 次,每次间隔 1 周。首次免疫使用弗氏完全佐剂,加强免疫使用弗氏不完全佐剂。末次免疫 1 周后采集兔颈动脉血,分离血清。免疫前取耳缘静脉血作阴性对照。免疫血清的检测:(1)间接 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA):以重组 JEV NS1 蛋白包被 96 孔板,100 ng/孔,一抗为经磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)系列稀释的兔免疫血清,以 HRP 酶标的羊抗兔 IgG 为二抗,测 A₄₅₀ 值。(2)间接免疫荧光:制备乙型脑炎病毒感染的 BHK-21 细胞抗原片,以 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600 系列稀释的兔血清为一抗, FITC 标记的羊抗兔血清为二抗,荧光显微镜下观察抗原片。

2 结果

2.1 重组质粒的构建及鉴定(图 1) 以 JEV 病毒 cDNA 第一链为模板,扩增 NS1 基因,琼脂糖凝胶电泳显示在 2 000 ~ 1 000 bp 有条带,与目的基因大小 1 245 bp 相符。重组质粒 pET30a-JEV NS1 测序结果显示,NS1 基因与 NCBI 公布的乙脑病毒 SA14-14-2 株(AF315119)的相应区段序列完全一致,同源性为 100%。

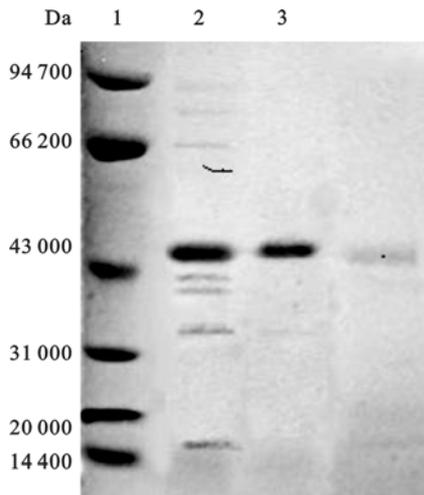


注:1. DNA 分子量标记(DL2000);2. 乙脑病毒 NS1 基因。

图 1 JEV NS1 基因 PCR 扩增结果

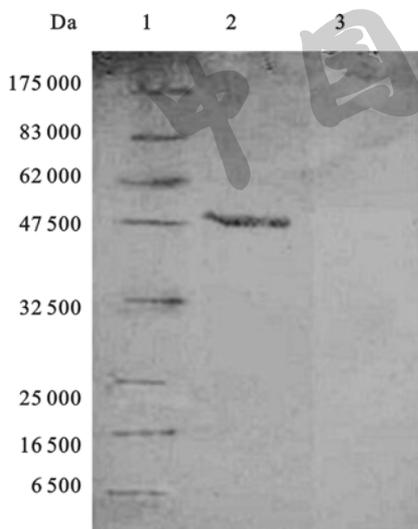
2.2 JEV NS1 重组蛋白鉴定(图 2、3) NS1 蛋白的预期分子量为 47 kD,纯化后的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳分析结果表明蛋白的分子量与预期基本一致。Western bolt 结果显示,重组抗原与乙脑病毒免疫的鼠多克隆腹水反应,在相应分子量位置出现条带,与正常鼠腹水不反应。

2.3 重组蛋白免疫血清鉴定(图 4) 以纯化后的重组蛋白 100 ng/孔包板,末次免疫后血清的效价达



注:1 为蛋白分子量标记;2 和 3 为乙脑 NS1 蛋白。

图 2 Ni⁺亲和层析纯化 JEV NS1 重组蛋白 SDS-PAGE 结果



注:1:蛋白分子量标记;2:乙脑 NS1 蛋白;3:阴性对照。

图 3 JEV NS1 蛋白 Western Bolt 分析结果

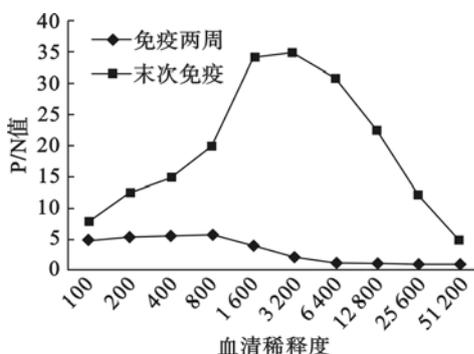


图 4 ELISA 检测 JEV NS1 免疫兔血清抗体效价结果

到 1:51 200 以上。以免疫前血清为阴性对照,则免疫后 2 周血清与末次免疫后血清 A₄₅₀ 的 P/N 值见图 4,表明随着免疫时间的增加,抗体效价在逐渐升高。

间接免疫荧光检测结果显示,将末次免疫后多抗血清作 1:50、1:100、1:200 稀释时,JEV 感染的 BHK 细胞均显示荧光,荧光强度为依次为:“++++”、“+++”、“+”。

3 讨论

黄病毒 NS1 蛋白是一种分泌型糖基化蛋白,在黄病毒科中高度保守。病毒感染哺乳动物细胞时,NS1 蛋白主要以 3 种方式存在^[5-6]:(1)与细胞内的细胞器相连;(2)通过选择性运输途径分泌到细胞表面;(3)以可溶性的糖基化方式释放到细胞上清中。NS1 蛋白在病毒的感染与免疫机制中的作用尚不清楚,采用基因工程技术表达 NS1 蛋白对于深入研究其功能及用途具有重要意义。

本研究采用原核表达系统表达 JEV NS1 蛋白,获得了与预期分子量一致的 JEV NS1 蛋白,经 weston blot 检测、间接 ELISA 及间接免疫荧光检测均证实获得的 NS1 蛋白具有免疫原性。原核表达系统的优点是可产生大量蛋白,基因导入简单,成本较低。但其也存在一些难以克服的缺点,如有些基因的持续表达可能会对宿主细胞产生毒害作用;目的蛋白常以包涵体形式表达,导致产物纯化困难;翻译后加工修饰体系不完善。本研究发现,JEV NS1 蛋白的表达量不大,纯化工作也较困难,多次实验均发现在梯度透析复性过程中会有较多的蛋白变性沉淀,导致复性蛋白的得率较低,尝试使用不同的复性体系和复性方法,未能得到理想结果。进一步工作中,可通过优化密码子,寻找合适的复性方法、采用真核表达系统等尝试提高 JEV NS1 蛋白的表达量。

参考文献

- [1] 唐晓燕,李幸乐,康锴,等.河南省部分地区病毒性脑炎监测分析[J].中国公共卫生,2012,28(7):967-970.
- [2] 张少白,李艺星,杨俊峰,等.陕西省 2005 年病毒性脑炎监测结果分析[J].中国公共卫生,2007,23(9):1114-1116.
- [3] Shu PY,Chen LK,Chang SF,et al. Dengue virus serotyping based on envelope and membrane and nonstructural protein NS1 serotype-specific capture immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays[J]. Microbiol,2004,42:2489-2494.
- [4] Costa SM,Freire MS,Alves AMB. DNA vaccine against the non-structural 1 protein(NS1) of dengue 2 virus[J]. Vaccine,2005, JAVC;5570-7773.
- [5] Walter E,Robert D,Philip K. Dengue virions and antigen in brain and serum of infected mice[J]. Virol,1970a,6:500-506.
- [6] Mackenzie JM,Jones MK,Young PR. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication[J]. Virology,1996,220:232-240.

收稿日期:2012-11-16

(韩仰欢编辑 张翠校对)